UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN AUSWERTUNG DER VERSCHIEDENEN LIPOPROTEIN-FRAKTIONEN IM SERUM NACH TRENNUNG MIT HILFE DER POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Rudolf Fuchs

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 · Corneliusstraße 21 · Tel.: 26 81 77

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor Prof. Dr. N. Zöllner

Untersuchungen zur quantitativen Auswertung der verschiedenen Lipoprotein-Fraktionen im Serum nach Trennung mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Fuchs
aus
Ruhpolding

Jahr
1977

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. W. Kaiser
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	25. 1. 1977



INHALTSVERZEICHNIS

I.	Abkürzungen	2
II.	Einleitung	3
III.	Methoden zur Trennung der Serumlipoproteine beim Menschen Eigene Untersuchungen	5
IV.	Methodik	8
V.	Ergebnisse und Diskussion	16
	a. Densitometrische Bestimmung der mit Sudanschwarz gefärbten Lipoproteine	18
	b. Quantitative Bestimmung des Farbgehaltes der einzelnen Lipoproteinfraktionen verschiedener Patientenseren	20
	c. Cholesterinfärbung der einzelnen Lipoproteinfraktionen im Polyacrylamidgel	21
	d. Direkte Bestimmung des Cholesterins in den Lipoproteinfraktionen	21
VI.	Zusammenfassung	24
VII.	Abbildungen und Tabellen	
VIII.	Literaturübersicht	
IX.	Lebenslauf	

I. ABKÜRZUNGEN

α-Lipoproteine	HDL	high density lipoproteins (d = 1,063 - 1,21)
ß-Lipoproteine	LDL	low density lipoproteins (d = 1,006 - 1063)
prä-ß-Lipoproteine	VLDL	very low density lipoproteins (d = 1,006)

TEMED	N,N,N',N''-Tetramethylethylendiamin
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

II. EINLEITUNG

An einem Zusammenhang zwischen abnormer Lipidparameter und der Anfälligkeit für Coronarsklerose ist nicht mehr zu zweifeln. Die phänotypische Differenzierung der Hyperlipoproteinämien, wie sie von Fredrickson und Lees (2.) beschrieben wurde, gründet sich auf mehrere Parameter.

1. Die genaue Kenntnis der Plasmakonzentrationen der verschiedenen Lipoproteine.
2. die Familienanamnese
3. die klinische Symptomatik und evt.
4. auf die therapeutische Beeinflußbarkeit.

Seitdem Fredrickson und Lees (2.) 1956 ein System zur Charakterisierung der Hyperlipoproteinämien entwarfen, wurde immer dringender danach gesucht vor allem die präß- und ß-Lipoproteine genauer zu studieren und ihre spezifischen Lipoproteinkonzentrationen bzw. deren Zusammensetzung im Zusammenhang mit ihrer krankheitsspezifischen Wirkung zu untersuchen.

So wurden verschiedene Methoden vorgeschlagen zur Bestimmung der Konzentrationen der Serumlipoproteine. Meist basierten diese auf der Fähigkeit der Lipoproteine, Komplexe mit polyanionischen Makromolekülen zu bilden (3,4,5,). Sulfatierte Polysaccharide (saure Mukopolysaccharide) werden dabei oft benützt, da diese in Gegenwart bestimmter Kationen, besonder Ca^{++}, mit den prä-ß- und ß-Lipoproteinen unlösliche Komplexe bilden. Zur Routinediagnostik von Serumlipidstörungen werden heutzutage vor allem das Gesamtcholesterin, die Serumtriglyceride und das Elektrophoresemuster der Lipoproteine bestimmt. Zur Einteilung der Hyperlipoproteinämien werden verschiedene elektrophoretische Techniken an unterschiedlichen Trägermaterialien verwendet.

Vor allem aus pathophysiologischen, diagnostischen und therapeutischen Gründen erscheint es erforderlich, die absoluten Serumlipoproteinkonzentrationen exakt (und nicht relativ) und vor allem die Lipidzusammensetzung der Einzelfraktionen quantitativ bei den verschiedenen Typen der Hyperlipoproteinämien zu bestimmen. Diese Forderung nach exakter Differenzierung der Hyperlipoproteinämien wird durch gewichtige Argumente unterstützt:
Bei etwa 10 % der Bevölkerung (BRD) kann eine Hyperlipoproteinämie festgestellt werden, für kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Hyperlipoproteinämien (je nach Typ unterschiedlich) Hauptrisikofaktoren, die Therapie ist abhängig von der Klassifizierung. D.h. mit einer reproduzierbaren Methode sollte versucht werden 1. eine sichere Trennung der einzelnen Lipoproteinfraktionen und damit Klassifizierung bzw. Zuordnung des Serumlipoproteinmusters zu verschiedenen Gruppen und 2. eine quantitative Bestimmung von Cholesterin und evt. Triglyceriden in den elektrophoretisch getrennten Fraktionen durchzuführen. Da die meisten Patienten mit pathologischen Lipoproteinmustern in die Kategorie Typ II oder Typ IV nach Fredrickson fallen, ist auch - zumal die Therapie der beiden Typen etwas unterschiedlich ist - eine sichere Unterscheidung zumindest dieser beiden Typen notwendig.

III. METHODEN ZUR TRENNUNG DER SERUMLIPOPROTEINE BEIM MENSCHEN

Eine Aussage über den Typ einer Hyperlipoproteinämie kann in der Regel meist auf der Kenntnis von 3 Parametern getroffen werden: der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Serum und dem Verteilungsmuster der Serumlipoproteine. Im allgemeinen läßt sich mit diesen Parametern der weitaus größte Teil der Hyperlipoproteinämien diagnostizieren. Zur sicheren Typisierung einiger Hyperlipoproteinämien müssen jedoch zusätzliche Maßnahmen eingesetzt werden, nämlich die Fraktionierung in der Ultrazentrifuge und die Bestimmung des ß-Cholesterins, d.h. des auf die ß-Lipoproteine entfallenden Cholesterinanteils.

Die Lipoproteinelektrophorese ermöglicht eine Trennung der Serumlipoproteine in verschiedene Klassen. Auf Grund des damit erhaltenen Lipoproteinmusters werden die Hyperlipoproteinämien klassifiziert.

Für diese elektrophoretische Trennung der Serumlipoproteine stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung: Papierelektrophorese (7,8), Elektrophorese in Agarose (9,10), Elektrophorese in Reinagar (11,12), Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (13), Elektrophorese auf Zellulose-Acetat-Folien (14,15) und Agarose-Gel-Elektrophorese (16,17).

Bei routinemäßigem Gebrauch werden heute bevorzugt die Zellulose-Azetat-Folien und das Agarose-Gel als Trägermaterial verwendet.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt die Lipoproteine sowohl auf Grund ihrer Größe als auch der Ladung. Die Trennung beruht damit auf der Kombination von zwei Trennungsprinzipien: des Molekularsiebeffekts und der elektrischen Beweglichkeit der Lipoproteine.

Nachdem sich in unseren Untersuchungen gezeigt hatte (1), daß in bezug auf Reproduzierbarkeit, Standardisierung und Trennfähigkeit menschlicher Serumproteine die Stufengradienten-Gelelektrophorese den anderen geprüften Methoden überlegen war, wurde dann ausschließlich diese Trennmethode für die hier vorliegenden Untersuchungen verwendet.

Im Rahmen von Voruntersuchungen waren nämlich verschiedene Trennverfahren gemeinsam mit Beltle (1) untersucht worden, die sich sowohl hinsichtlich des Trägergels als auch der verwendeten Puffer unterschieden.

a) Trennung der Serumlipoproteine an Polyacrylamid-Gel mit einheitlicher Porengröße.
b) PAGE in kontinuierlichen Gelgradienten
c) Trennung mit Hilfe des Sephadex-Saccharid-Disk-Elektrophorese
d) Trennung an Polyacrylamid-Gel mit diskontinuierlicher Porengröße, d.h. diskontinuierlichem Stufengradienten-Gel.

Dabei hatte sich gezeigt, daß die PAGE mit kontinuierlichen Gelgradienten zwar ein sehr gutes Auflösungsvermögen der einzelnen Lipoproteinfraktionen ergab, diese Trennung aus technischen Gründen (mangelhafte Reproduzierbarkeit bzw. Standardisierung des Gelgradienten von Serie zu Serie) jedoch nicht für größere Serienbestimmungen herangezogen

werden konnte. Aus der kontinuierlichen Polyacrylamid-Gelgradienten-Elektrophorese konnten jedoch die für eine optimale Trennung vor allem der prä-ß- und ß-Lipoproteine erforderlichen Gelkonzentrationen abgeschätzt werden. Auf diese Weise suchten wir die für eine Trennung der prä-ß- und ß-Banden günstigsten Trennbedingungen.

Die semiquantitative Bestimmung der verschiedenen mit der PAGE getrennten Fraktionen setzt voraus, daß der Background des Trenngels niedrig und die Lipidfärbung der Fraktionen hoch und reproduzierbar ist.

Aus den zusammen mit Beltle (1) erarbeiteten Untersuchungen ergaben sich für das hier im weiteren geübte Trennsystem mit der diskontinuierlichen Disk-Elektrophorese folgende allgemeine Verbesserungen gegenüber anderen Methoden.

1) eine bessere und deutliche Trennung bzw. Auflösung der prä-ß- und ß-Banden.
2) eine Interferenzfreiheit durch Chylomikronen, da diese vollständig im Obergel bzw. Probengel verbleiben.
3) durch die Vorfärbung mit Sudanschwarz eine sofortige Auswertung nach der Elektrophorese ohne Färben und Entfärben.
4) ein transparenter Untergrund für die nachfolgende Densitometrie
5) kurze Analysenzeit und konstante Reproduzierbarkeit.

Zur besseren Quantifizierung der Lipoproteingehalte der einzelnen Fraktionen wurde in den hier vorliegenden Untersuchungen darüberhinaus die Extinktion der Sudanschwarzfärbung genauer registriert, indem die extrahierten Lipoproteinfraktionen direkt im Photometer gemessen werden.

IV. METHODIK UND MATERIALIEN

a) Serumproben:

Alle Blutproben wurden morgens nach einer Fastenperiode von mindestens 12 - 14 Stunden abgenommen. Die Blutproben wurden sofort bei 2000 upm 15 - 20 Minuten zentrifugiert und die Serumproben bei 4° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Personen standen unter Normalkost. Es wurde darauf geachtet, daß die Proben innerhalb von 8 - 12 Stunden nach der Blutentnahme (maximal bis zu 48 Stunden) durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) getrennt wurden.

b) Substanzen und verwendete Apparatur:

Die Stufengradienten-Gelelektrophorese wie sie für die Trennung der Serumlipoproteine hier verwendet wird, wurde eigens in Gemeinschaftsarbeit für diese Untersuchungen ausgearbeitet (1).

Substanzen und verwendete Apparatur:

I. Reagenzien: Polyacrylamid in Substanz $F_p = 84^{\circ}$-86°
Bis = N,N'-Methylenbisacrylamid
Kaliumferricyanid
Tris = N,N,N'N'-Tetramethyläthylendiamin
1 n HCL (20 ml konz. HCL + 222 ml aqua dest.)
Riboflavin
Glycin in Substanz
Sudanschwarz 10 B (Merck)
Äthylenglycol für Chromatographie (Merck)
Siliconlösung (Fa. Serva)

II. Geräte: Glassäulen: Länge ca. 14 cm
Durchmesser 5 mm
Glasdicke 1 mm
Elektrophoresekammer mit Wasserkühlung (siehe Abbildung)Herstellung nach eigenen Angaben
UV-Lampe
Wasserstrahlpumpe
Pipette (1 ml) mit Verlängerungsschlauch aus Plastik
Densitometer

III. Herstellung der Lösungen

Lösung 1: 9,5 %ige Polyacrylamidlösung enthält:
19 g Acrylamid
0,57 g Bis
0,0075 g Kaliumferricyanid ad 50 ml aqua dest.

Lösung 2: 3,75 %ige Polyacrylamidlösung enthält:
7,5 g Acrylamid
0,225 g Bis
0,0075 g Kaliumferricyanid ad 50 ml aqua dest.

Lösung 3: 3,6 %ige Polyacrylamidlösung enthält:
7,2 g Acrylamid
0,216 g Bis
0,0075 g Kaliumferricyanid ad 50 ml aqua dest.

Lösung 1 - 3 gelten als Untergellösung

Lösung 4: Obergellösung (d) enthält:
5,5 g Acrylamid
1,25 g Bis ad 50 ml aqua dest.

Lösung 5: Untergelpuffer pH 8,8 enthält:
ca. 29 g Tris
0,47 ml Temed
48 ml 1 n HCL ad 100 ml aqua dest.
(Exakte pH-Einstellung erfolgt mit dem pH-Meter und durch Zugabe von Tris bei konstanter Temperatur von 20° C)

Lösung 6: Obergelpuffer pH 6,9 enthält:
ca. 5,6 g Tris
0,4 ml Temed
48 ml 1 n HCL ad 100 ml aqua dest. (pH-Einstellung siehe Lösung 5)

Lösung 7: Riboflavin als Katalysator für die Polymerisation 4 mg Riboflavin ad 100 ml aqua dest.

Lösung 8: Elektrodenpuffer pH 8,9 enthält:
28,8 g Glycin in Substanz
6,0 g Tris ad 100 ml aqua dest.
Zur Elektrophorese 1 : 3 verdünnen

Lösung 9: Sudanschwarzlösung
0,5 g Sudanschwarz
9 ml Äthylenglycol
Nach vollständiger Lösung filtrieren (s. Literatur 24)

Lösung 10: Eingefärbtes Serum
Zu 0,5 ml Serum gibt man 0,175 ml von der standardisierten Sudanschwarzlösung. Gut mischen lassen auf einem Rotationsmischer (ca. 15 Min.).

Arbeitsvorgang

Vorbereitung der Glassäulen

Zuerst werden die sauberen Glassäulen silikonisiert. Dazu spült man die Glassäulen mit Silikonlösung durch.

Anschließend trocknet man sie im Sterilisator 1 Stunde bei 100° C. Nach ca. 10 maligem Gebrauch müssen die Säulen jeweils neu silikonisiert werden. Die silikonisierten Glassäulen werden nun mit Parafilm an einer Seite fest verschlossen. Dann stellt man die Säulen in einen dafür hergerichteten Ständer, wobei das Gestell des Ständers keinen Schatten auf den Bereich der zu polimerisierenden Säulen werfen darf (während der UV-Bestrahlung).

Herstellung der Gelsäulen

Die Gelsäule besteht aus drei Unterschichten und einer Oberschicht. Man gibt nun in vier Bechergläser die verschiedenen Gelansätze, mit Ausnahme der Lösung 7 (Riboflavin). Diese darf jeweils erst kurz vor dem Einfüllen in die Säulen hinzugegeben werden, da sonst eine zu schnelle Polymerisation erfolgt.

Zusammensetzung der Gelkonzentrationen:

Untergellösung c_1 = 9,5 %ig	1 Teil 1 a (Untergelpuffer pH 8,8)
	2 Teile 1 c_1 (Lösung 1)
	4 Teile aqua dest.
	1 Teil 1 e (Ribobfavin)
Untergellösung c_2 = 3,75 %ig Ansatz siehe Untergellösung c_1	
Untergellösung c_3 = 3,60 %ig Ansatz siehe oben	
Obergellösung d	1 Teil 1 b (Obergelpuffer pH 6,9)
	1,5 Reile 1 d (Lösung 4)
	4 Teile aqua dest.
	1 Teil 1 e (Riboflavin)

Die Ansätze mischt man gut durch, ohne Luftblasen in der Lösung zu erzeugen. Sie dürfen nicht im UV-Bereich stehen, da sonst schon die Polimerisation erfolgt.

Stufengradienten-Gel (s. Abb. 1)

Die Glasrährchen werden mit den verschiedenen Polyacrylamid-Konzentrationen gefüllt, d.h. nach vollständiger Polymerisation des untersten Gels werden schrittweise die nächsten Gelkonzentrationen einpolymerisiert.

Auftragen des Serums zur Elektrophorese

Zur vollständigen Anfärbung der einzelnen Lipoproteinbanden mit Sudanschwarz 10 B muß mindestens 12 Stunden vorgefärbt werden. Zur Elektrophorese werden 0,035 ml (Serum und Sudanschwarz) aufgetragen. Zur Vermeidung einer Mischung wird vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet.

Zur Färbung der Serumlipoproteine bei der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Färbung mit Sudanschwarz

Die Serumlipoproteinmuster zeigen qualitativ und in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit keinen wesentlichen Unterschied zwischen vergleichbaren Seren, die mit Sudanschwarz B vor der elektrophoretischen Trennung vorgefärbt waren und jenen Mustern, die erhalten wurden, wenn die Gele nach der elektrophoretischen Trennung der Serumlipoproteine mit Sudanschwarz gefärbt wurden. Nachteil der letzteren Methode ist jedoch ein längerer Zeitaufwand und ein nicht vollständig reproduzierbares Quellen bzw. Schrumpfen der Gele in der Entfärbelösung, so daß eine systematische densitometrische Auswertung nicht möglich ist.

Ein weiterer Vorteil der Vorfärbung der Serumlipoproteine mit Sudanschwarz ist die Möglichkeit, die elektrophoreti-

sche Trennung der einzelnen Fraktionen während der Untersuchung beobachten zu können. Eine Klassifizierung in die verschiedenen Hyperlipoproteinämie-Formen wäre somit durch Inspektion sofort möglich.

Färbung mit Lipid Crimson

Bei der Färbung der verschiedenen Lipoproteinfraktionen mit Lipid Crimson erhält man im Vergleich zur Sudanschwarz-Färbung vergleichbares Färbeverhalten der Serumlipoproteine. Diese Färbemethode ergibt somit keine Vorteile für die Untersuchung der Serumlipoproteine. Der Vorteil der Sudanschwarz-Färbung liegt darin, daß das Serum vor der Elektrophorese angefärbt werden kann, die elektrophoretische Trennung kann laufend beobachtet werden.

Färbung der Lipoproteine mit Oil Red O

Das Lipoproteinmuster zeigte bei diesen beiden Färbungen keine wesentlichen Unterschiede zum Färbeverhalten mit Sudanschwarz B.

Plasmalipoproteine bei cholestatischem Ikterus

Das Serumlipoproteinmuster bei Pateinten mit cholestatischem Ikterus ist charakterisiert durch:

1. eine verminderte HDL-Konzentration
2. eine erhöhte LDL-Konzentration
3. durch den Nachweis eines spezifischen Lipoproteins LP-X in der LDL-Fraktion

Bei zwei Patienten mit cholestatischem Ikterus konnten wir sowohl bei der elektrophoretischen Trennung an Polyacrylamid-Gel mit kontinuierlichem Gelgradienten als

auch an Stufengradienten-Gel eine von der LDL(ß)-Fraktion deutlich abgesetzte Lipoproteinfraktion nachweisen. Das LP-X wäre somit auch bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter unseren Bedingungen nachweisbar.

c) Densitometrische Auswertung (s. Abb. 2a und b, sowie Abb 3)

Bei der Messung muß das Gel genau zur Bewegungsrichtung des Abtastspaltes parallel liegen und nur eine kleine, mittlere Zone des Gels darf beleuchtet werden. Zur Registrierung der Meßwerte wurde ein Linienschreiber an das Gerät angeschlossen mit einem zusätzlichen Integrator, der die Fläche unter der Kurve angibt. Die unter den einzelnen Banden liegenden Abschnitte der Integralkurven geben die optische Dichte der Banden an. Die Auswertung der Kurven geschah wie folgt (s. Abb. 3).

d) Extraktion der an der Polyacrylamid-Gelsäule getrennten Lipoproteinfraktionen und Bestimmung des Sudanschwarzgehaltes bzw. des Cholesteringehaltes

I. Sudanschwarzgehalt

Die einzelnen auf der PAGE getrennten Fraktionen, die durch die Vorfärbung mit Sudanschwarz gut sichtbar sind, werden geschnitten, mit 6 ml aqua dest. im Ultra-Turrax unter Kühlung homogenisiert und anschließend bei 20.000 rpm 30 Minuten lang zentrifugiert. Diese Extraktion wird verbessert indem man statt aqua dest. 6 ml Äthylacetat zur Extraktion verwendet. Die Extinktion des Überstandes wird bei 590 nM im Zeiss-Photometer gemessen.

II. Bestimmung des Gesamtcholesterins in den einzelnen Fraktionen

Die Lage der nicht vorgefärbten Fraktionen wird durch ein parallel mitgelaufenes, vorgefärbtes Serum lokalisiert. Die Extraktion der Lipoproteine geschieht wie oben. Das Cholesterin im Überstand wird mit der Cholesterinesterase-Cholesterinoxydase-Methode nach Boehringer bestimmt.

V. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie aus den gemeinsamen Untersuchungen mit Beltle (1) hervorging, erzielten wir von den verschiedenen Varianten der PAGE und für Routinediagnostik reproduzierbar geeignet, die besten Trennergebnisse mit einer in der Gelkonzentration diskontinuierlichen Disk-Elektrophorese. Dabei weist die für die Trennung am besten geeignete Polyacrylamid-Gel-Säule von oben nach unten folgende Konzentrationen auf: Obergel 2,5 %ig, pH 6,9; Trenngel 3,6 %ig, 3,75 %ig und 9,5 %ig (s. Abb. 1). Auf diese Weise erreichten wir eine sichere, reproduzierbare Auftrennung der mit Sudanschwarz vorgefärbten Serumlipoproteine in mindestens 4 deutlich voneinander getrennte Banden. Während die Chylomikronen und überschüssiges Sudanschwarz am Start liegenbleiben, durchwandern die prä-ß-Lipoproteine das Obergel und sammeln sich im oberen Teil des 3,6 %igen Trenngels an. Das weitere Trenngel (3,75 %) wurde in seiner Konzentration und Länge so ausgewählt, daß die ß-Lipoproteine sich hier sammeln können.

Dabei wurde beobachtet, daß sich individuell oder bei verschiedenen Hyperlipoproteinämien in der ß-Lipoproteinbande oft deutlich bis zu 3 Einzelbanden reproduzierbar abgrenzen lassen. Diesem Befund wurde jedoch nicht näher nachgegangen; bei Patienten mit cholestatischem Ikterus schien dies jedoch deutlicher zu sein. Bei der Hyperlipoproteinämie vom Typ III, oder "ß-desease", (in unseren Fällen mit der Ultrazentrifugation gesicherte Patienten) kommt es mit unserer Methode zu keiner deutlichen Trennung der prä-ß- von der ß-Bande, d.h. wir beobachteten in den meisten Fällen eine breite ß-Bande, die unmittelbar an die prä-ß-Bande anschließt. Eine sichere

Klassifizierung zwischen Typ III sowie dem Typ II und IV allein auf Grund der PAGE-Elektrophorese scheint nicht gegeben zu sein, diese Differenzierung ist wahrscheinlich ohne weitere Kriterien nicht möglich. Im Augenblick gibt es einige Vorschläge für eine sichere Differenzierung des Typ III (Ultrazentrifugation, Immunelektrophorese, kombinierte Papier-Polyacrylamidelektrophorese), die jedoch alle für das Routinelabor nicht brauchbar sind (6).

Die α-Lipoproteine sammeln sich im 19,5 %igen Gel in 2 Banden, davon getrennt ist die gering angefärbte Albuminfraktion.Für welche Trennmethode man sich auch bei der Auftrennung der Lipoproteine entscheidet, sie muß einige wesentliche Anforderungen erfüllen, wenn sie für den klinischen Gebrauch verwendet werden soll.

1. eine klare Trennung in die einzelnen Lipoproteinklassen (Chylomikronen, prä-ß-, ß- und -Lipoproteine)
2. Eignung für routinemäßige Verwendung hinsichtlich Aufwand und Kapazität.
3. Gewährleistung einer ausreichenden Reproduzierbarkeit.

Alle diese Voraussetzungen sind mit der von uns entwickelten diskontinuierlichen PAGE erfüllt.

Für das Routineverfahren genügt im allgemeinen eine Methode, in der das Lipoproteinmuster zuverlässig abgelesen werden kann.

In dieser Arbeit ging es nun darum, ob die densitormetrische Auswertung des Lipoproteinmusters nach PAGE erstens möglich ist, zweitens reproduzierbare Werte liefert und drittens zusätzlich Informationen ergibt. Die densitometrische Registrierung hätte den zusätzlichen Vorteil einer Verlaufsbeobachtung der Lipoproteinwerte z.B. unter Therapie.

a. Densitometrische Bestimmung der mit Sudanschwarz vorgefärbten Lipoproteinfraktionen

Für die qualitative Auswertung von Serumlipoproteinen genügt also meist die Feststellung, wieviele Banden sich durch die Elektrophorese darstellen lassen und wo sie liegen, d.h. die visuelle Begutachtung. Auch für die PAGE ist eine wirklich quantitative Bestimmung der die Banden bildenden Substanzmengen durch Densitometrie nicht exakt möglich. Als einige der Gründe hierfür seien genannt: Probleme des stöchiometrischen Färbens, der unterschiedlichen Färbbarkeit der verschiedenen Lipidanteile (freie Sterine, veresterte Sterine, Doppelbindungen der freien Fettsäuren) durch die verschiedenen Farbreaktionen für Lipoproteine, die inhomogene Verteilung der Lipoproteine im Gel, das eventuelle Überlappen benachbarter Banden und Lichtbrechung an der Oberfläche des Gels. Für viele Fälle genügt es aber, die einzelnen Fraktionen quantitativ untereinander zu vergleichen. Hierfür ist eine reproduzierbare Messung der Transmission oder optischen Dichte längs des Gels erforderlich. Die von uns bei der densitometrischen Messung erhaltenen Abschnitte der Integralkurve unter den einzelnen Lipoproteinbanden geben die optische Dichte dieser Banden wieder. Unter gewissen Voraussetzungen kann daraus abgelesen werden, in welchem Verhältnis die angefärbte Lipoproteinmenge einzelner Banden zueinander oder zur Gesamtmenge der Lipoproteine stehen. Die wichtigsten Voraussetzungen hierfür sind, daß das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt, daß der Extinktionskoeffizient in allen Banden derselbe ist und daß die Lipoproteinmuster senkrecht zur Achse des Gels homogen verteilt sind. Falls diese Forderungen erfüllt sind, ergibt die Integralkurve zumindest untereinander praktisch brauchbare Werte.

Abb. 2a und b zeigt als Beispiel die Lipoproteinelektrophorese von 2 verschiedenen menschlichen Seren an einem diskontinuierlichen Gradientengel und dessen densitometrische Auswertung. Annähernd quantitative Aussagen innerhalb einer Serie sind natürlich ohne ständige Kontrolle mit einem Standardserum nicht möglich.

Unter den hier aufgeführten theoretischen Vorbehalten wurde von uns eine größere Serie (etwa 500 Serumproben) von normalen und, in bezug auf ihren Lipoproteingehalt, pathologischen Seren - z.B. nach einiger Zeit wiederholt - densitometrisch untersucht. Dabei kamen wir zu folgenden Ergebnissen (s. Abb. 1): eine quantitative, reproduzierbare Aussage über das Lipoproteinmuster ist durch die PAGE möglich. Quantitative Änderungen im Lipoproteinmuster lassen sich mit den gleichzeitig bestimmten Serumkonzentrationen von Cholesterin und Triglyceriden korrelieren, sowohl in bezug auf die Typisierung des Lipoproteinmusters als auch in der quantitativen Änderung der einzelnen Lipoproteinmuster z.B. durch Therapie.

Zur statistischen Analyse der Variation der Methode ist die untersuchte Zahl aber nicht ausreichend.

Für die normale klinische Routinediagnostik reichten in unseren Händen die semiquantitative, densitometrische Auswertung der mit der PAGE getrennten Serumproben zu einer sicheren Typisierung der Hyperlipoproteinämien (Abb. 1). Für Verlaufsbeobachtungen oder wissenschaftliche Fragestellungen scheint diese Methode nicht ausreichend. Aus diesem Grund versuchten wir eine bessere Quantifizierung zumindest der Sudanschwarzfärbung durch indirekte Messung der aus der Gelsäule extrahierten Lipoproteinfraktionen.

b. Quantitative Bestimmung des Färbegehaltes der einzelnen Lipoproteinfraktionen verschiedener Patientenseren

Ausgewertet (s. Tab. 1 - 3) wurden 70 verschiedene Patientenseren. Davon waren nach klinischen und sonstigen laborchemischen Untersuchungen 22 Normalpatienten, 30 Patienten mit Hyperlipoproteinämien vom Typ II und 18 vom Typ IV. Die α-Lipoproteine aller Seren zeigen eine Sudanschwarzfärbung, die etwa 16 Relativprozent ausmacht. Wesentliche Unterschiede sind hier zwischen den verschiedenen Gruppen nicht zu erkennen und auch nicht zu erwarten. Berechnet man das Verhältnis der Sudanschwarzfärbung von ß/präß, so ergeben sich doch recht unterschiedliche Zahlen. Bei Normalseren beträgt dieses Verhältnis etwa 2, bei Patienten mit Typ II HL etwa 3 und bei Patienten mit Typ IV etwa 1.

Während für Normalpersonen die Relativprozente in prä-ß etwa 27 %, für ß etwa 57 % betragen, sind sie bei Typ II-Hyperlipoproteinämien etwa 20 für prä-ß und 60 für ß und für Typ IV HL etwa 40 für prä-ß und 40 für die ß-Lipoproteinfärbung mit Sudanschwarz.

Es kann nicht bezweifelt werden, daß diese Bestimmung, bei der die Sudanschwarzfärbung der einzelnen Lipoproteingruppen nach Extraktion aus dem Polyacrylamidgel direkt als Extinktion im Photometer gemessen wird, der densitometrischen Auswertung in bezug auf die Genauigkeit weit überlegen ist.

Der Zeitaufwand für das Schneiden der Gelsäulen, die Homogenisierung der einzelnen Fraktionen im Ultra-Turrax, die Zentrifugation und die Messung der Extink-

tion im Photometer ist dabei gering. Für Verlaufsbeobachtungen z.B. unter einer Therapie würde sich dieses Verfahren eignen.

c. Cholesterinfärbung der einzelnen Lipoproteinfraktionen im Polyacrylamidgel

Es wurden verschiedene Methoden zur direkten Sichtbarmachung des Cholesterins im Polyacrylamidgel untersucht. Sie sind jedoch alle zu aggressiv, so daß eine anschließende Densitometrie nicht mehr möglich wäre. Praktikabel ist die Sichtbarmachung des freien Cholesterins durch Inkubation des Gels in äthanolischer Digitoninlösung. Dabei wird das überschüssige, nicht gebundene Digitonin mit Äthanol eliminiert. Die Lipoproteinbanden ergeben durch Darstellung des freien Cholesterins auf diese Weise weiße Banden. Eine Quantifizierung des freien Cholesterins ist jedoch im Gel nicht möglich. Zusätzliche Differenzierungsmittel bei der Typisierung einer Hyperlipoproteinämie wie z.B. die Bestimmung des ß-Cholesterins, also des auf die ß-Lipoproteine entfallenden Cholesterinanteils können manchmal nötig werden.

d. Bestimmung des Cholesterins in den Lipoproteinfraktionen

Auch nach der Trennung und densitometrischen Auswertung der Lipoproteine mit Hilfe der PAGE sehen wir zahlreiche Lipoproteinmuster, die es uns äußerst schwierig, wenn nicht gar unmöglich machen, den Patienten einem eindeutigen Hyperlipoproteinämietyp zuzuordnen.

So geschieht z.B. die Zuordnung zum Typ II im wesentlichen auf Grund der Konzentrationen an ß-Lipoproteinen oder genauer einer erhöhten Konzentration an Cholesterin im Bereich der ß-Lipoproteine, während eine erhöhte Konzentration oder besser eine vermehrte Konzentration an prä-ß-Lipoproteinen auf einen Typ IV hinweist. Größere Schwierigkeiten bei der Zuordnung entstehen aber, wenn sowohl ß- wie prä-ß-Lipoproteine vermehrt sind oder wenn eine breitere Bande im ß-/prä-ß-Bereich zu finden ist. In letzteren Fällen kann die aufwendigere Fraktionierung der Lipoproteine in der Ultrazentrifuge zum Beweis oder Ausschluß eines Typ III herangezogen werden. Für die Diagnose einer Typ III-Hyperlipoproteinämie sind nach Shephard et al. (18) z.Zt. folgende Kriterien erforderlich.

a) Der Nachweis von Lipoproteinen mit ß-Mobilität und
b) ein Verhältnis von ß-Cholesterin/Plasmatriglyceride über 0,3, wenn die Plasmatriglycerid-Konzentration im Bereich von 150 - 1000 mg/100 ml ist.

Wie in Methodik ausführlich dargestellt wurden hierzu jeweils Paralleluntersuchungen eines Serums durchgeführt. Nach der Elektrophorese im gleichen Lauf wurden die beiden Gelsäulen (eines davon mit Sudanschwarz vorgefärbt) in die einzelnen Lipoproteinfraktionen geschnitten.

Die Anzahl der hierzu durchgeführten Untersuchungen ist zu gering, um definitive Aussagen zu machen (s. Tab. 4). Es sollte hier lediglich untersucht werden, ob und mit welchem Aufwand die quantitative Bestimmung des Cholesterins (und der Triglyceride) in den einzelnen Lipoproteinfraktionen, nach sicherer und reproduzierbarer Trennung mit der Polyacrylamid-Elektrophorese, möglich ist.

Der Prozentsatz, des aus den einzelnen Fraktionen wieder gefundenen Cholesterins schwankt zwischen 65 und 100 %, könnte aber sicher noch verbessert werden.

Bei der Frage, ob die Sudanschwarzfärbung in etwa eine Aussage über das ß-Cholesterin zuläßt, ergibt sich folgendes: Dividiert man in Tab. 4 die Relativprozente der Sudanschwarzfärbung durch die entsprechenden Relativprozente der ß-Cholesterinwerte, so ergibt sich mit nur geringen Abweichungen jeweils der Wert 1. D.h. aus der Sudanschwarzfärbung kann man im Bereich der ß-Lipoproteine annähernd auf den Cholesteringehalt schließen, für die prä-ß- und α-Lipoproteine scheint dies nicht zuzutreffen. Die Sudanschwarzfärbung beruht auf der Anzahl der Doppelbindungen in den Lipiden, d.h. es werden besonders die Fettsäuren der Cholesterinester und der Triglyceride in die Färbung eingehen. Allerdings muß man hier nochmals darauf hinweisen, daß die Anzahl der Untersuchungen für klare Aussagen zu gering ist.

Auf dieselbe Weise haben wir auch die Triglyceride in den einzelnen Fraktionen gemessen, auch hier ist die untersuchte Anzahl zu gering, um Aussagen machen zu können. Es sollte hier lediglich gezeigt werden, daß wir mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine gute Typisierung, eine sichere Quantifizierung der Sudanschwarzfärbung der einzelnen Lipoproteinfraktionen durchführen können. Mit einigem zeitlichen Aufwand gelingt auch noch die Bestimmung des Cholesterins (und der Triglyceride) in den einzelnen Lipoproteinfraktionen nach der Trennung.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die hier verwendete Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese trennt die Serumlipoproteine auf der Basis sowohl der Größe als auch der Ladung auf schnelle, leicht zu standardisierende, sensitive und gut reproduzierbare Weise. Durch die Vorfärbung des Serums mit Sudanschwarz kann die Trennung der Lipoproteine bereits während des Laufs beobachtet und unmittelbar nach der Elektrophorese quantitativ densitometriert werden. An etwa 500 Serumproben konnten wir die relative Verteilung der Lipoproteinfraktionen bei verschiedenen Hyperlipoproteinämien densitometrisch auswerten.

Relativverteilungen der Lipoproteinfraktionen auf Grund ihrer Anfärbbarkeit mit Sudanschwarz erhielten wir durch Extraktion der Lipoproteinfraktionen aus dem Polyacrylamid-Gel und direkte Messung des Sudanschwarzgehaltes im Photometer. Aus etwa 70 Serumproben ergaben sich dabei für einzelne Typen von Hyperlipoproteinämien charakteristische bzw. indikative Verteilungsmuster.

Es konnte auch gezeigt werden, daß mit der hier verwendeten Methode auf relativ einfache Weise der Cholesterin (und Triglycerid-) -gehalt der einzelnen Lipoproteinfraktionen bestimmt werden konnte.

VII.

Obergel 2,5% | 3,6%

Trenngel 3,75% | 9,5%

	Normal	Typ I 1 Fall	Typ II	Typ III	Typ IV	Typ V
Chylomikronen		95				stark erhöht
prä-β	20-25	2	15-20	45 „broad-β"	30-40	40-45
Zwischenschicht						
β	45-55		60-65	15	35-45	20-25
α	20-25	5	15-20	30	20-25	25-30

Normales Serum

Abb. 1: Diskontinuierliche Disk-Elektrophorese von Serumlipoproteinen. Relative Verteilung der einzelnen Fraktionen (Relativprozent) bei verschiedenen Hyperlipoproteinämien (densitometrische Auswertung von etwa 500 Serumproben).

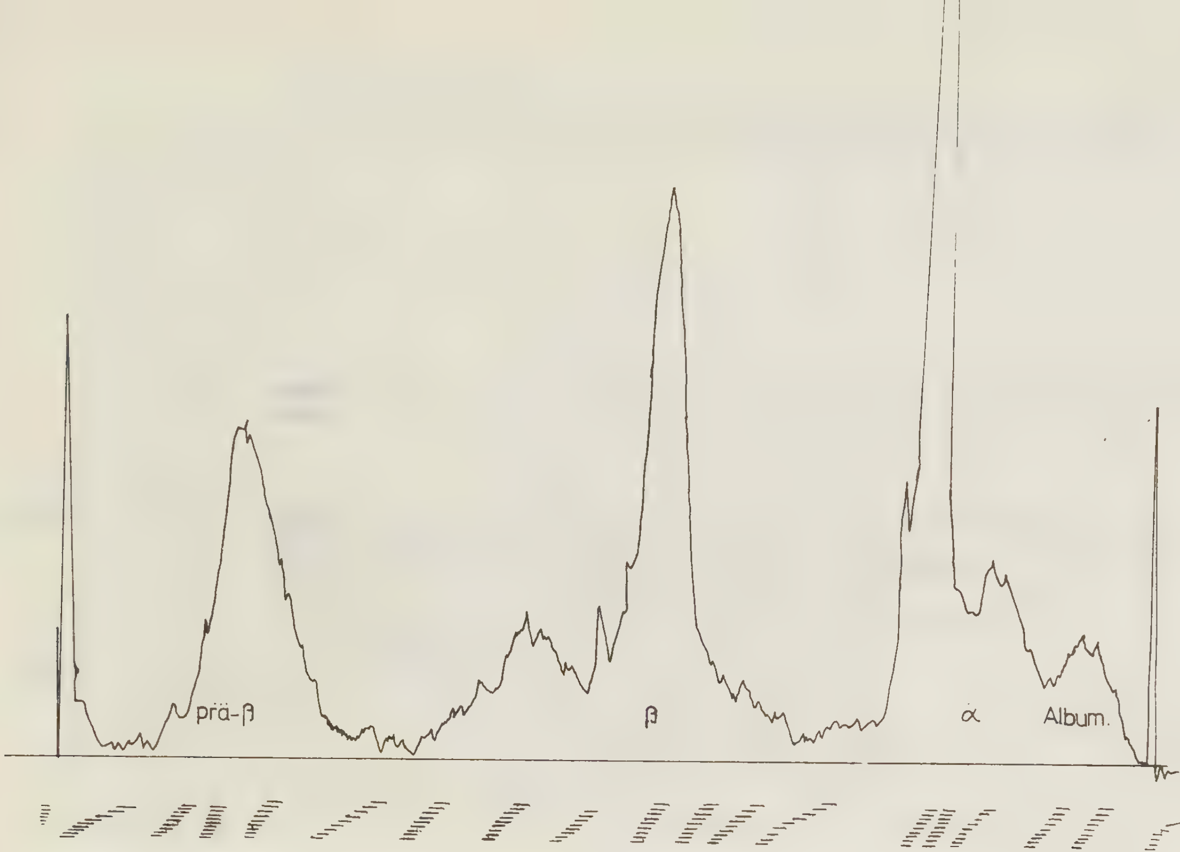


Abb. 2a: PAGE-Lipoproteinelektrophorese von Serum.
Registrierung der optischen Dichte (Extinktionskurve) bei 590 nm und Integralmessung der optischen Dichte (unten).

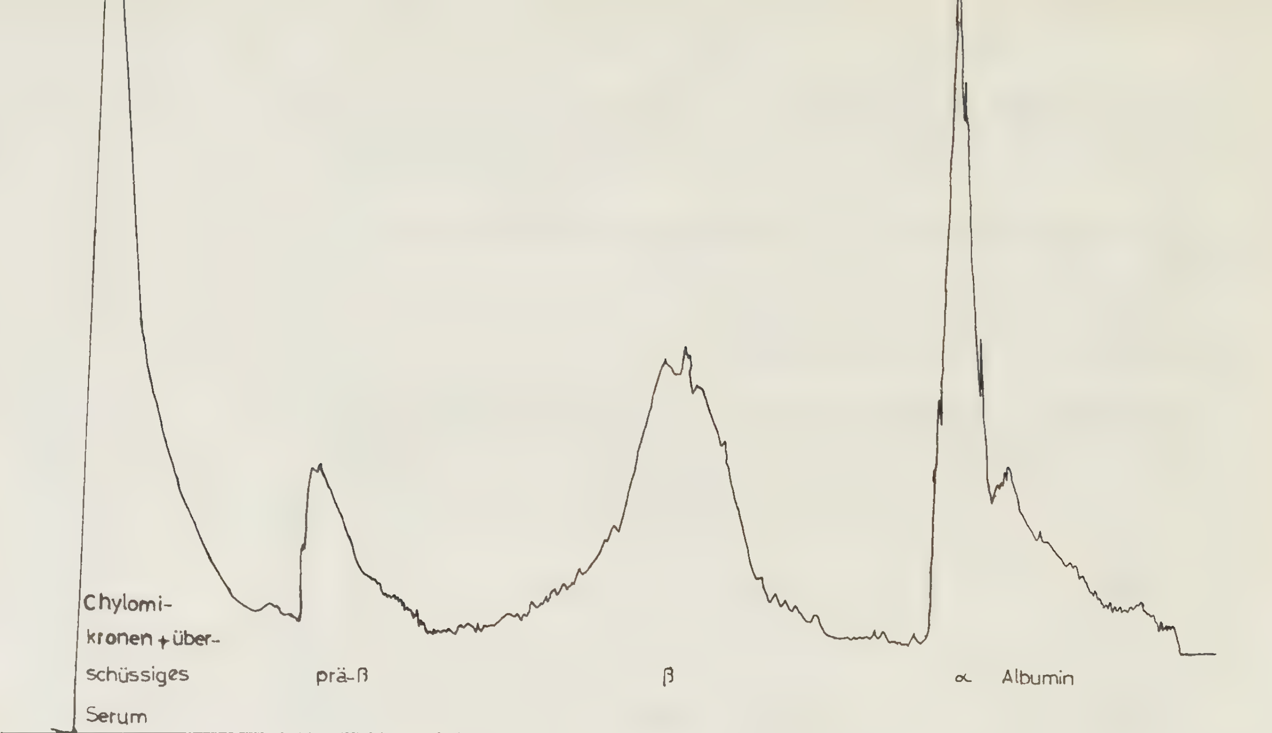
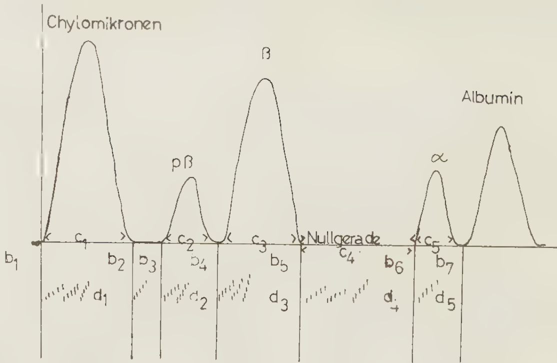


Abbildung 2b:

Auswertung der Kurven:



Chylomikronen $= D_1 = d_1 - \frac{d_4}{c_4} \times c_1$

Gesamtstriche $= D_2+D_3+D_5$

$(D_2 = d_2 - \frac{d_4}{c_4} \times c_2)$

$(D_3 = d_3 - \frac{d_4}{c_4} \times c_3$ usw.)

präß $= \frac{100 \times D_2}{D_2+D_3+D_5}$

ß $= \frac{100 \times D_3}{D_2+D_3+D_4}$

$= \frac{100 \times D_3}{D_2+D_3+D_5}$

1. "Nullgerade" = Strecke zwischen ß und aufsuchen
2. Gerade durch Nullgerade über den ganzen Kurvenverlauf ziehen
3. einzelne Fraktionen durch Senkrechte (b_1, b_2, b_3, usw.) auf dieser Geraden abgrenzen
4. Länge der dadurch entstehenden Streckenabschnitte (c_1, c_2, c_3 usw.) in cm ausmessen
5. Die dazugehörigen Integrationsstriche auszählen (d_1, d_2, c_3 usw.) in cm ausmessen
6. Berechnung der Absolutstriche:
   a) $\frac{d_4}{c_4}$ = Anzahl der Integrationsstriche, die Gerät angibt, wenn keine Farbstoffänderung im Röhrchen ist. (Striche pro cm)
   b) $\frac{d_4}{c_4} \times c_1$ (bzw. c_2, c_3 usw.) = Anzahl der Integrationsstriche, die das Gerät pro Fraktion "zuviel" angibt
   c) also: ausgezählte Integrationsstriche (d_1, d_2, d_3 usw.) $- \frac{d_4}{c_4} \times c_1$ (bzw. c_2, c_3 usw.) =
   $= D_1$ (D_2, D_3)
7. Chylomikronen werden direkt in Integrationsstrichen angegeben.
8. Prozentuale Aufteilung von präß, ß : $(D_2 + D_3 + D_5) = 100$ %; D_2 (bzw. D_3, D_5) = x %
   (= Gesamtzahl der Integrationsstriche = Zeichen für Lipidgehalt des Serums)

präß $= \frac{100 \times D_2}{D_2 + D_3 + D_5}$; ß $= \frac{100 \times D_3}{D_2 + D_3 + D_5}$; $= \frac{100 \times D_5}{D_2 + D_3 + D_5}$;

Pat.Nr.	Färbung mit Sudanschwarz (Rel%)			ß/präß
	präß	ß		
30	20	59	21	2,99
31	23,7	60,5	15,8	2,54
37	28	56	16	1,96
39	30	60	10	2,02
42	23	66	11	1,96
43	31	53	16	1,69
54	23,9	57,3	18,8	2,39
57	30	57	13	1,92
59	23	52,6	24,4	2,29
62	22,8	52,2	25	2,28
69	29	61	10	2,08
73	25	49	26	1,97
77	35	58	7	1,64
80	27	61	12	2,27
81	24	65	11	2,69
84	29	53	18	1,87
85	33	58	9	1,75
75	34	59	8	1,73
91	27	48	25	1,76
95	30	58	12	1,85
110	25	55	20	2,20
111	27	52	21	1,93
Σ 22	27,29±4,0	56,85±4,67	15,91±6,04	2,08±0,35

Tab. 1: Nach klinischen und laborchemischen Befunden handelt es sich hier um Seren von Normalpersonen.

Pat.Nr.	Färbung mit Sudanschwarz (Rel%)			ß/präß
	präß	ß		
29	26	62	12	2,39
40	21	64	15	3,10
41	15	67	18	4,42
44	13	67	20	5,15
45	22	56	22	2,95
47	30	52	18	1,7
48	17	54	29	3,2
52	25	59	16	2,36
53	17	54	29	3,17
60	17	51	32	3,0
61	19	61	20	3,21
64	20	63	17	3,15
51	19	59	22	3,16
68	14	78	8	5,63
79	15	69	16	4,58
82	16	74	10	4,64
76	16	69	15	4,21
78	20	60	20	3,66
87	20	69	11	3,44
88	15	54	31	3,5
89	26	61	13	2,33
96	16	65	19	4,10
92	18	73	9	4,06
97	21	71	8	3,33
98	16	58	25	3,55
100	15	70	15	4,66
102	16	68	16	4,25
103	17	65	18	3,8
99	15	70	15	4,66
113	20	65	15	3,25
Σ 30	18,57±4,04	63,6±6,97	17,8±6,47	3,62±0,89

Tab. 2: Nach klinischen und sonstigen laborchemischen Befunden handelt es sich hier um Seren von Patienten mit Typ II Hyperlipoproteinämien.

Pat.Nr.	Färbung mit Sudanschwarz (Rel%)			ß/präß
	präß	ß		
32	43	46	11	1,07
35	36	30	34	0,89
36	50	31	19	0,89
38	45	42	11	0,91
46	33	36	31	1,09
33	49	29	22	0,6
56	40	50	10	1,25
58	38	55	7	1,45
63	28	57	15	2,03
55	47	53	13	1,14
56	45	46	9	1,01
72	57	32	11	0,56
74	45	46	9	1,01
82	44	44	12	1,0
86	46	40	14	0,86
90	49	33	18	0,69
94	52	36	12	0,69
118	61	23	16	0,4
Σ 18	44,89±8,06	40,5±9,83	15,22±7,37	Σ 0,97±0,37
				$\bar{x} \pm s$

Tab. 3: Nach klinischen und sonstigen laborchemischen Befunden handelt es sich hier um Seren von Patienten mit Typ IV - Hyperlipoproteinämie.

Nr.	klin. Typi-sierung	Ges.chole-sterin im Serum mg%	% wiedergef. Chol. in d. Fraktionen	Färbung mit Su-danschwarz Rel %			Cholesterin mg % (Rel%)			ß/präß Färb.	ß/präß Chol.	Ges.Chol.mg % / ß-Chol.mg %
				präß	ß	α	präß	ß	α			
30	N	177	100	20	59	21	21(12)	105(59)	51(29)	2,99	3,39	1,4
31	N	244	92	23,7	60,5	15,8	35(16)	116(52)	73(33)	2,54	3,37	2,1
37	N	240	76	28	56	16	26(12)	133(60)	64(29)	1,96	5,15	1,8
39	N	196	100	30	60	10	30(15)	122(62)	45(23)	2,02	4,07	1,61
43	N	206	100	31	53	16	21(10)	112(54)	73(35)	1,69	5,24	1,84
29	II	232	87	26	62	12	34(16)	128(62)	45(22)	2,39	3,75	1,23
26	II									2,95	5,4	1,7
42	II	309	65	23	66	11	28(14)	148(74)	25(12)	1,96	5,2	2,1
32	IV	244	64	43	46	11	29(19)	88(56)	39(25)	1,07	3,04	2,76
35	IV	192	98	36	30	34	61(33)	41(22)	81(44)	0,89	0,66	4,74
36	IV	178	84	50	31	19	33(22)	63(42)	54(36)	0,89	1,93	2,82
38	IV	244	65	45	42	11	58(36)	61(38)	40(25)	0,91	1,05	4,01

Tab. 4:

VIII. LITERATURÜBERSICHT

1) Beltle, M., Untersuchungen zur Trennung der menschlichen Serumlipoproteine mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese Inauguraldissertation, München (1972)

2) Fredrickson, D. S. und R. S. Lees, Circulation, 31, 321 (1965)

3) Burstein, M., J. Samaille, J. Physiol., 49, 83 (1957)

4) Bernfeld, P., M. E. Berkowitz, V. M. Donakne, J.Clin.Invest. 36, 1363 (1957)

5) Boyle, E., V. R. Moore,J.Lab.Clin.Med. 53, 272 (1959)

6) Wieland, H., D. Seidel, Clin.Chem. 19/10 1139 - 1141 (1973)

7) Jencks, W. P., E. L. Durrum: J.Clin.Invest. 34, 1437 (1955)

8) Lees, R. S., F. T. Hatch, J.Lab.Clin.Med. 61, 518 (1963)

9) Pezold, F, Clin.Chim.Acta 3, 40 (1958)

10) Uriel, J., P. Grabar, Bull.Soc.Chim.Biol. (Paris) 38 1253 (1956)

11) Houtsmuller, A. J., Clin.Chim.Acta 9, 497 (1964)

12) Wieme, R. J., Arscia (Bruxelles) 87 (1959)

13) Davis, B. J., Ann.N.Y.Acad.Sci. 121, 404 (1964)

14) Charman, R. C., R. S. Landowne, Analyt.Biochem. 19, 177 (1967)

15) Chin, H. P., D. H. Blankenhorn, Clin.Chim.Acta 20, 305, (1968)

16) Kahlke, W., W. Rapp, Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 73, 828, (1967)

17) Noble, R. P., J. Lipid Res. 9, 693, (1968)

18) Shephard, J., Packard, Ch. J., Dryburgh, F. J., a. Third L.H.C. Clin.Chem. 21, 1887-1891 (1975)

LEBENSLAUF

Am 14. 2. 1946 wurde ich, Rudolf Georg Fuchs als Sohn von Frau Mathilde Fuchs, geb. Frey, und Herrn Otto Fuchs in Traunstein geboren. Am 1. 9. 1952 trat ich in die Volksschule in Traunstein und am 1. 9. 1957 in das Humanistische Gymnasium in Traunstein ein. Am 19. 7. 1967 legte ich dort mit Erfolg meine Reifeprüfung ab. Nach zweimonatigem Krankenpflegepraktikum begann ich am 1. 11. 1967 mit dem Studium der Tiermedizin, wechselte nach bestandener naturwissenschaftlicher Vorprüfung in die Medizinische Fakultät; nach weiteren 3 Semestern legte ich im Sommersemester 1970 die ärztliche Vorprüfung ab. Am 29. 6. 1973 bestand ich die ärztliche Prüfung mit Erfolg. Meine Medizinalassistentenzeit legte ich an den Kreiskrankenhäusern Freilassing und Kaufbeuren ab. Nach meiner Approbation im August 1974 blieb ich als chirurgischer Assistent in Kaufbeuren. Am 7. 4. 1975 wurde ich zur Ableistung des Wehrdienstes zur Bundeswehr einberufen. Nach meiner Entlassung im Juni 1976 ließ ich mich an meinem Heimatort Ruhpolding als prakt. Arzt nieder.